

GENÔMICA FUNCIONAL DE FUNGOS MICOPARASITAS¹

Marcio Gilberto Cardoso Costa²
Camila Carvalho Pimentel da Cruz e Joice Andréia Aguiar Santos Nascimento³
Niere Fernanda de Almeida Souza⁴
Eduardo de Aquino Ximenes e Renato Delmondez Castro⁵
Luzimar Gonzaga Fernandez⁶
Carlos Roberto Félix e Janice Lisboa de Marco⁷
Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho⁸
Leandro Lopes Loguercio⁹
Alan Pomella¹⁰

1. INTRODUÇÃO

A revolução da genômica tem mudado o paradigma para a análise dos processos e sistemas biológicos. Atualmente, esses processos e sistemas podem ser descritos baseados na comparação global e quantitativa dos padrões de expressão gênica de células e tecidos, representando diferentes situações experimentais. Uma variedade de técnicas inovadoras tem sido desenvolvida nesse sentido para analisar a expressão gênica ao nível de mRNA (transcriptoma). Tais métodos incluem *microarrays* (SCHENA *et al.*, 1995), *differential display* (LIANG e PARDEE, 1992), SAGE (VELCULESCU *et al.*, 1995), cDNA AFLP (BACHEM *et al.*, 1996), TOGA (SUTCLIFFE *et al.*, 2000) e GC (SHIMKETS *et al.*, 1999). No entanto, a descoberta de mecanismos pós-transcricionais que controlam a taxa de síntese e a meia-vida das proteínas (VARSHAVSKY, 1996) e a ausência de uma correlação preditiva entre os níveis de proteínas e seus mRNAs correspondentes (FUTCHER *et al.*, 1999; GYGI *et al.*, 1999) indicam que a análise do conteúdo total de proteínas (proteoma) também é necessária. Nesse sentido, a proteômica surge como uma importante ferramenta para a análise funcional dos genomas, com o potencial de acelerar a previsão da função de genes desconhecidos. A proteômica pode ser definida como a análise global da expressão gênica ao nível de proteína, e o método padrão de análise combina a separação de proteínas em gel de eletroforese bi-dimensional (2-DE) com a identificação das proteínas selecionadas por espectrometria de massa.

A presente linha de pesquisa, desenvolvida no Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA da Universidade Católica do Salvador – UCSal, consiste na análise funcional de genomas de fungos micoparasitas, com ênfase em proteômica, visando um melhor entendimento do mecanismo biológico envolvido no processo de micoparasitismo de fungos fitopatogênicos. O projeto que vem

¹ O trabalho conta com apoio financeiro da FAPESB – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, em colaboração com o Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA/UCSal, Universidade de Brasília - UnB, Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Recursos Genéticos e Biotecnologia - EMBRAPA/CENARGEN e Almirante Cacau/M&M Mars.

² Coordenador do Projeto, Pesquisador, Doutor do Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA da Universidade Católica do Salvador – UCSal.

³ Acadêmicas do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Católica do Salvador – UCSal, bolsistas de Iniciação Científica FAPESB/LEMA/UCSal.

⁴ Bióloga, bolsista Apoio Técnico FAPESB/LEMA/UCSal.

⁵ Pesquisadores, Doutores do Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA da Universidade Católica do Salvador – UCSal.

⁶ Pesquisadora, Doutora do Laboratório de Estudos em Meio Ambiente – LEMA da Universidade Católica do Salvador – UCSal e Professora do Instituto de Ciências da Saúde – ICS da Universidade Federal da Bahia – UFBA.

⁷ Pesquisadores, Pós-Doutores da Universidade de Brasília – UnB.

⁸ Pesquisador, Pós-Doutor da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/CENARGEN.

⁹ Pesquisador, Doutor da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC.

¹⁰ Pesquisador, Doutor da Almirante Cacau/M&M Mars.

sendo desenvolvido atualmente nesta linha de pesquisa é o “Projeto Proteoma de *Trichoderma stromaticum*: identificação, caracterização e análise funcional de proteínas envolvidas no controle biológico do patógeno de cacau *Crinipellis pernicioso*”. O presente projeto investiga o proteoma de *Trichoderma stromaticum*, que tem sido considerado como um dos agentes de controle biológico de maior potencial no combate à vassoura-de-bruxa do cacau, causada por *Crinipellis pernicioso*. Essa investigação permitirá o isolamento das proteínas e dos genes relacionados ao processo de micoparasitismo e, em ações de pesquisas posteriores e com base nos dados a serem gerados neste projeto, estabelecer-se-á alternativas consistentes e instrumentos eficazes para o controle econômica e ecologicamente sustentável de *C. pernicioso*. O projeto conta com a participação de diferentes instituições colaboradoras, como UnB, UESC, EMBRAPA/CENARGEN e Almirante Cacau/M&M Mars.

2. METODOLOGIA

- Seleção dos isolados de fungos e indução do metabolismo de micoparasitismo: os isolados de maior e menor potencial de controle biológico de fungos fitopatogênicos serão selecionados e crescidos em meio de cultura contendo parede celular ou micélio do hospedeiro inativado por temperatura como fonte de carbono (DE MARCO *et al.*, 2000).
- Eletroforese bi-dimensional (2DE): para o isolamento e separação do complemento total de proteínas dos fungos micoparasitas, a preparação das amostras, focalização isoelétrica e SDS-PAGE serão efetuadas segundo as instruções da Amersham Pharmacia Biotech, EUA.
- Espectrometria de massa: as proteínas diferenciais, expressas sob condições simuladas de micoparasitismo, serão excisadas do gel, descoradas, digeridas em solução de tripsina e examinadas por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF, seguindo as instruções do fabricante (Applied Biosystems, EUA).
- Análise computacional: mapas peptídicos serão gerados empregando-se o software MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>), que também será utilizado na identificação de proteínas conhecidas ou ORFs traduzidas presentes nos bancos de dados do NCBI e SWISS-Prot.
- Construção de um banco de dados de proteínas: um banco de dados de mapas peptídicos e seqüência parcial de proteínas de fungos micoparasitas envolvidas no processo de controle biológico de fungos fitopatogênicos, será construído no LEMA/UCSal.
- Isolamento dos genes codificando para as proteínas de interesse: a técnica de RT-PCR será utilizada para o isolamento dos genes codificando para as proteínas diferenciais identificadas no presente estudo.
- Transformação genética de *Trichoderma stromaticum*: os procedimentos de transformação genética de *T. stromaticum* com os vetores de expressão contendo os genes de interesse serão baseados nas metodologias descritas por PENTTILÄ *et al.* (1987) e SHI *et al.* (1995).
- Avaliação do potencial antagônico dos isolados transformantes de *T. stromaticum*: o potencial antagônico dos isolados transformantes de *T. stromaticum* será avaliado em ensaios de laboratório, casa-de-vegetação e campo.

3. RESULTADOS ESPERADOS E PERSPECTIVAS

A vassoura-de-bruxa do cacauzeiro constitui-se atualmente no principal problema fitopatológico das regiões produtoras de cacau do Continente Americano, atingindo, no Brasil, os cacauais da Amazônia (Pará, Rondônia, Amazonas, Mato Grosso e Acre) e, especialmente, do estado da Bahia, a maior região produtora de cacau do País. Além do impacto econômico, destaca-se ainda a crise social e a degradação do que ainda resta do ecossistema Mata Atlântica, causadas pela doença (DIAS, 2001). Até o presente momento, ainda não existe um meio de controle efetivo da vassoura-de-bruxa, visto que as tecnologias disponíveis aos agricultores controlam a doença apenas parcialmente. Por outro lado, Bastos (1996) isolou uma cepa de *Trichoderma* da região Amazônica hiperparasitando basidiocarpos de *C. pernicioso*. Recentemente, esse isolado foi reclassificado como uma nova espécie de *Trichoderma*, denominada *Trichoderma stromaticum* (SAMUELS *et al.*, 2000). Os resultados dos experimentos têm sido promissores, demonstrando que essa espécie pode reduzir em 99 % a formação de basidiocarpos em vassouras em contato com o solo e em 56 % em vassouras presas à planta (HEBBAR *et al.*, 1999). A base molecular deste micoparasitismo é ainda em muito desconhecida. A análise funcional do genoma de fungos micoparasitas, como *Trichoderma stromaticum*, permitirá o isolamento das proteínas e dos genes relacionados a este processo. Produtos e/ou processos biotecnológicos poderão ser gerados a partir desses resultados, como a identificação de agentes de controle biológico mais eficientes, obtenção de novos agentes de controle biológico, produção de plantas resistentes a fungos fitopatogênicos, dentre outros.

4. REFERÊNCIAS

BACHEM, C.W.; HOEVEN, R.S.; VAN DER BRUIJN, S.M. de; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M.; VISSER, R.G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, 9, 1996, pp. 745-753.

BASTOS, C.N. Mycoparasitic nature of the antagonism between *Trichoderma viride* and *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira*, 21, 1, 1996, pp. 50-54.

DE MARCO, J.L.; LIMA, L.H.C.; SOUSA, M.V.; FELIX, C.R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 2000, pp.383-386.

DIAS, L.A.S. **Melhoramento genético do cacauzeiro**. Viçosa: UFV; Imprensa Universitária, 2001.

FUTCHER, B.; LATTER, G.I.; MONARDO, P.; McLAUGHLIN, C.S.; GARRELS, J.I. A sampling of the yeast proteome. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 1999, pp. 7357-7368.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 1999, pp.1720-1730.

HEBBAR, K.P.; LUMSDEN, R.D.; KRAUSS, U.; SOBERANIS, W.; LAMBERT, S.; MACHADO, R.; DESSIMONI, C.; AITKEN, M. Biocontrol of cocoa diseases in Latin America – Status of field trials. In: KRAUSS, U; HEBBAR, K.P. (Eds.) **Research Methodology in Biocontrol of Plant Diseases with Special Reference to Fungal Diseases of Cocoa**. Costa Rica: CATIE, 1999. pp. 19-28.

- LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257, 1992, pp.967-971.
- PENTTILÄ, M.; NEVALAINEN, H.; RÄTTÖ, M.; SALMINEN, E.; KNOWLES, J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Gene*, 61, 1987, pp. 155-164.
- SAMUELS, G.J.; PARDO-SCHULTHEISS, R.; HEBBAR, K.P.; LUMSDEN, R.D.; BASTOS, C.N.; COSTA, J.C.; BEZERRA, J.L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research*, 104, 2000, pp. 760-764.
- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270, 1995, pp. 467-470.
- SHI, Z.; CHRISTIAN, D.; LEUNG, H. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. *Phytopathology*, 85, 1995, pp.29-333.
- SHIMKETS, R.A.; LOWE, D.G.; TAI, J.T.-N.; SEHL, P.; JIN, H.; YANG, R.; PREDKI, P.F.; ROTHBERG, B.E.G.; MURTHA, M.T.; ROTH, M.E.; SHENOY, S.G.; WINDEMUTH, A.; SIMPSON, J.W.; SIMONS, J.F.; DALEY, M.P.; GOLD, S.A.; McKENNA, M.P.; HILLAN, K.; WENT, G.T.; ROTHBERG, J.M. Gene expression analysis by transcript profiling coupled to a gene database query. *Nature Biotechnology*, 17, 1999, pp. 798-803.
- SUTCLIFFE, J.G.; FOYE, P.E.; ERLANDER, M.G.; HILBUSH, B.S.; BODZIN, L.J.; DURHAM, J.T.; HASEL, K.W. TOGA: an automated parsing technology for analyzing expression of nearly all genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 97, 2000, pp. 1976-1981.
- VARSHAVSKY, A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 93, 1996, pp.12142-12149.
- VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. *Science*, 270, 1995, pp. 484-487.